

JP 01/784
EUV

日本国特許庁

05.02.01

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

2000年 2月 4日

出願番号

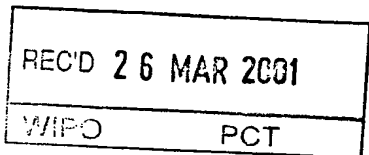
Application Number:

特願2000-027988

出願人

Applicant(s):

松下電器産業株式会社

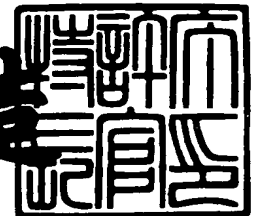


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2001年 3月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3015074

【書類名】 特許願

【整理番号】 2892010245

【提出日】 平成12年 2月 4日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/543

【発明者】

【住所又は居所】 香川県高松市古新町 8 番地の 1 松下寿電子工業株式会
社内

【氏名】 高橋 三枝

【発明者】

【住所又は居所】 香川県高松市古新町 8 番地の 1 松下寿電子工業株式会
社内

【氏名】 灘岡 正剛

【発明者】

【住所又は居所】 香川県高松市古新町 8 番地の 1 松下寿電子工業株式会
社内

【氏名】 田中 宏橋

【特許出願人】

【識別番号】 000005821

【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100081813

【弁理士】

【氏名又は名称】 早瀬 憲一

【電話番号】 06(6380)5822

【手数料の表示】

-----【予納台帳番号】-----013527-----

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9600402

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 クロマトグラフィー試験片、及びその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 複数の多孔質性材料を積層してなる、あるいは単層の多孔質性材料よりなるクロマトグラフィー試験片において、

クロマトグラフ分析で用いられる反応成分の少なくとも一つが固定化された反応層が、乾燥した際に固体となり得る性状の界面活性剤を含むことを特徴とするクロマトグラフィー試験片。

【請求項2】 請求項1に記載のクロマトグラフィー試験片において、

上記界面活性剤が、20以下のHLB値の界面活性剤を含むことを特徴とするクロマトグラフィー試験片。

【請求項3】 請求項1または2に記載のクロマトグラフィー試験片において、

上記界面活性剤が、非イオン性の界面活性剤を含むことを特徴とするクロマトグラフィー試験片。

【請求項4】 請求項1ないし3のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片において、

上記界面活性剤が、コール酸系の界面活性剤を含むことを特徴とするクロマトグラフィー試験片。

【請求項5】 請求項1ないし4のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片において、

上記界面活性剤が、親水部に糖をもつ界面活性剤を含むことを特徴とするクロマトグラフィー試験片。

【請求項6】 請求項1ないし5のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片において、

上記反応層は、上記界面活性剤を上記反応層の全体に含むことを特徴とするクロマトグラフィー試験片。

【請求項7】 請求項1ないし5のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片において、

上記反応層は、上記界面活性剤を上記反応層の一部に含むことを特徴とするクロマトグラフィー試験片。

【請求項 8】 クロマトグラフ分析で用いられる反応成分の少なくとも一つが固定化された反応層を有するクロマトグラフィー試験片の製造方法において、

乾燥した際に固体となり得る性状の界面活性剤を溶解した界面活性剤溶解液を、上記クロマトグラフィー試験片の反応層に含浸、あるいはコーティングするステップと、

上記反応層に、含浸、あるいはコーティングした界面活性剤溶解液を乾燥させるステップと、

を備えたことを特徴とするクロマトグラフィー試験片の製造方法。

【請求項 9】 請求項 8 に記載のクロマトグラフィー試験片の製造方法において、

上記界面活性剤が、20 以下の HLB 値の界面活性剤を含むことを特徴とするクロマトグラフィー試験片の製造方法。

【請求項 10】 請求項 8 または 9 に記載のクロマトグラフィー試験片の製造方法において、

上記界面活性剤が、非イオン性の界面活性剤を含むことを特徴とするクロマトグラフィー試験片の製造方法。

【請求項 11】 請求項 8 ないし 10 のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片の製造方法において、

上記界面活性剤が、コール酸系の界面活性剤を含むことを特徴とするクロマトグラフィー試験片の製造方法。

【請求項 12】 請求項 8 ないし 11 のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片の製造方法において、

上記界面活性剤が、親水部に糖をもつ界面活性剤を含むことを特徴とするクロマトグラフィー試験片の製造方法。

【請求項 13】 請求項 8 ないし 12 のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片の製造方法において、

上記反応層の乾燥が自然乾燥により行われることを特徴とするクロマトグラフ

イー試験片の製造方法。

【請求項14】 請求項8ないし12のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片の製造方法において、

上記反応層の乾燥が風乾により行われることを特徴とするクロマトグラフィー試験片の製造方法。

【請求項15】 請求項8ないし12のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片の製造方法において、

上記反応層の乾燥が凍結乾燥により行われることを特徴とするクロマトグラフィー試験片の製造方法。

【請求項16】 請求項8ないし15のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片の製造方法において、

上記界面活性剤溶解液が、上記反応層の全体に含浸、あるいはコーティングされたことを特徴とするクロマトグラフィー試験片の製造方法。

【請求項17】 請求項8ないし15のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片の製造方法において、

上記界面活性剤溶解液が、上記反応層の一部に含浸、あるいはコーティングされたことを特徴とするクロマトグラフィー試験片の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、液体試料を定性あるいは定量分析するためのクロマトグラフィー試験片、及びその製造方法に関し、特に液体試料が均一に展開するものに関する。

【0002】

【従来の技術】

従来より、水質検査や尿検査などの液体試料の化学試験、あるいは臨床試験を実施する方法として、抗原抗体反応や酵素反応を利用した、クロマトグラフィーによる測定方法が汎用されている。一般にクロマトグラフィーとは、混合物をその構成成分に応じて分離する方法をいう。

【0003】

図 8 は、クロマトグラフィーによる測定に使用される、従来のクロマトグラフィー試験片を示す図である。

図 8 において、クロマトグラフィー試験片 1 0 0 は、クロマトグラフィー材料を支持する反応層担体支持体 1 0 1 と、液体試料が添加される試料添加部 1 0 2 と、液体試料の浸透により移動可能な標識試薬を保持する標識物保持部位 1 0 3 と、流れてきた液体試料に含まれる分析対象物と特異的に結合する物質を備えた標識試薬と分析対象物との結合反応が行われる反応層 1 0 4 と、反応層 1 0 4 の領域上に、反応形式にあわせて、抗体あるいは抗原のような分析対象物に対して特異的に結合反応する特異的タンパク質を固定化する特異的タンパク固定化部 1 0 5 と、流れてきた液体試料を吸収する吸水部 1 0 6 とを備える。

【0 0 0 4】

次に、従来のクロマトグラフィー試験片 1 0 0 による測定方法について説明する。

液体試料が試料添加部 1 0 2 に添加されると、試料添加部 1 0 2 に浸透し、標識物保持部位 1 0 3 に達する。次に、標識物保持部位 1 0 3 の領域に保持された標識試薬が、液体試料の浸透により溶解され、液体試料と共に反応層 1 0 4 に浸透する。反応層 1 0 4 の領域上には、特異的タンパク質が固定化された特異的タンパク固定化部 1 0 5 がある。液体試料が分析対象物を含む場合は、特異的タンパク質が分析対象物と標識試薬との複合体に対して抗原抗体反応を起こし、特異的タンパク固定化部 1 0 5 の領域に何らかの呈色反応が見られる。液体試料が分析対象物を含まない場合は、抗原抗体反応は起こらず、呈色反応も見られない。最終的に、液体試料は吸水部 1 0 6 に吸収され、反応は終了する。この呈色反応を目視的、あるいは検出装置を用いて測定する。このように、クロマトグラフィーによる測定方法は、検査結果の判定が非常に容易であることから、用途範囲が広いのが特色である。

【0 0 0 5】

このクロマトグラフィーによる測定は、さまざまな分析対象物の検査に利用することが可能である。しかし、液体試料を添加するため、その試料のより均一な展開パターンが必要であり、また、その展開速度が反応層 1 0 4 での反応に影響

を与えるため、反応層 1 0 4 上の浸透性の向上が必要とされてきた。

【 0 0 0 6 】

クロマトグラフィー試験片の反応層の浸透性を向上させたものとして、特開昭 6 2 - 7 1 8 6 1 号公報には、免疫原理を用いた測定において H L B 値が 2 0 より大きい界面活性剤を添加する方法が開示されている。また、特開平 1 1 - 1 5 3 6 0 1 号公報には、試料添加部から反応層までの間に界面活性剤などを担持した添加剤含浸部を設ける方法が開示されている。

【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題】

従来のクロマトグラフィー試験片には、液体試料の浸透速度を機械的にコントロールする手段がなく、人為的に浸透速度を制御することができないために、液体試料の浸透速度は試験片の浸透性に左右される。そのため、浸透に大幅な時間を要したり、反応層上を進む試料の浸透が不均一であったり、特異的タンパク固定化部等の反応成分固定化部に試料が浸透しない部分が生じるなどにより、反応の正確性を欠くことになるという問題があった。

【 0 0 0 8 】

上記の問題点を解決するために、従来より、界面活性剤処理によるクロマトグラフィー試験片の浸透性能の向上が図られてきた。しかし、本来の性状が、液状またはペースト状である界面活性剤を用いた場合には、界面活性剤を絶乾状態まで乾燥させることが不可能であるため、クロマトグラフィー試験片の保存期間中に徐々に固定化抗体の失活が進み、試験片の性能が悪化してしまう。そのため、試験片の品質保持期限が短期間化する、あるいは試験片の保管条件が限定される等の問題があった。

【 0 0 0 9 】

また、クロマトグラフィーによる測定においては、試験片に液体試料を添加して一定時間の経過後に測定を行うが、界面活性剤処理を行った場合に、標識試薬の反応層への非特異吸着が起ることにより、標識試薬が反応層上にバックグラウンドとして残留することがある。このバックグラウンドの値が呈色度合に上乘せされると、検出計器を用いて測定を行う場合では、その誤差を含めて測定するこ

とになり、定量性能が低下するという問題があった。また、目視における判断でも、バックグラウンドの呈色が本来の呈色状況の判断を誤認させることになるという問題があった。

【0010】

また、特開昭62-71861号公報に開示されている測定方法では、浸透性を高めるために、20より大きいHLB値の界面活性剤が添加されているため、確かに浸透性と浸透速度とは向上するものの、その速度があまりに速いために測定に必要とされる反応が十分に行われず、測定の正確性を欠くことになる。

【0011】

また、特開平11-153601号公報に開示されているクロマトグラフィー試験片では、バックグラウンドの影響を軽減するために界面活性剤を試験片上の反応層より前の部位に含浸している。このクロマトグラフィー試験片を用いた場合には、特異的タンパク固定化部等の反応成分固定化部には界面活性剤が存在しないため、反応成分の失活や変性は生じない。しかし、浸透が進行する段階で固定化領域中の反応成分に十分試料が浸透しないため、均一に反応が行われず、測定の正確性を欠くことになる。

【0012】

本発明は、かかる問題点に鑑みてなされたものであり、バックグラウンドにおける標識試薬の残留量を最低限に抑え、液体試料の浸透性の向上と、より均一な液体試料の展開とにより反応性を向上させ、また、クロマトグラフィー試験片の保存安定性を向上させたクロマトグラフィー試験片、及びその製造方法を提供することを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するため、請求項1にかかるクロマトグラフィー試験片は、複数の多孔質性材料を積層してなる、あるいは単層の多孔質性材料よりなるクロマトグラフィー試験片において、クロマトグラフ分析で用いられる反応成分の少なくとも一つが固定化された反応層が、乾燥した際に固体となり得る性状の界面活性剤を含むことを特徴とするものである。

【 0 0 1 4 】

また、請求項 2 にかかるクロマトグラフィー試験片は、請求項 1 に記載のクロマトグラフィー試験片において、上記界面活性剤が、20 以下の HLB 値の界面活性剤を含むことを特徴とするものである。

【 0 0 1 5 】

また、請求項 3 にかかるクロマトグラフィー試験片は、請求項 1 または 2 に記載のクロマトグラフィー試験片において、上記界面活性剤が、非イオン性の界面活性剤を含むことを特徴とするものである。

【 0 0 1 6 】

また、請求項 4 にかかるクロマトグラフィー試験片は、請求項 1 ないし 3 のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片において、上記界面活性剤が、コール酸系の界面活性剤を含むことを特徴とするものである。

【 0 0 1 7 】

また、請求項 5 にかかるクロマトグラフィー試験片は、請求項 1 ないし 4 のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片において、上記界面活性剤が、親水部に糖をもつ界面活性剤を含むことを特徴とするものである。

【 0 0 1 8 】

また、請求項 6 にかかるクロマトグラフィー試験片は、請求項 1 ないし 5 のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片において、上記反応層は、上記界面活性剤を上記反応層の全体に含むことを特徴とするものである。

【 0 0 1 9 】

また、請求項 7 にかかるクロマトグラフィー試験片は、請求項 1 ないし 5 のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片において、上記反応層は、上記界面活性剤を上記反応層の一部に含むことを特徴とするものである。

【 0 0 2 0 】

また、請求項 8 にかかるクロマトグラフィー試験片の製造方法は、クロマトグラフ分析で用いられる反応成分の少なくとも一つが固定化された反応層を有するクロマトグラフィー試験片の製造方法において、乾燥した際に固体となり得る性状の界面活性剤を溶解した界面活性剤溶解液を、上記クロマトグラフィー試験片

の反応層に含浸、あるいはコーティングするステップと、上記反応層に、含浸、あるいはコーティングした界面活性剤溶解液を乾燥させるステップと、を備えたことを特徴とするものである。

【 0 0 2 1 】

また、請求項 9 にかかるクロマトグラフィー試験片の製造方法は、請求項 8 に記載のクロマトグラフィー試験片の製造方法において、上記界面活性剤が、20 以下の HLB 値の界面活性剤を含むことを特徴とするものである。

【 0 0 2 2 】

また、請求項 10 にかかるクロマトグラフィー試験片の製造方法は、請求項 8 または 9 に記載のクロマトグラフィー試験片の製造方法において、上記界面活性剤が、非イオン性の界面活性剤を含むことを特徴とするものである。

【 0 0 2 3 】

また、請求項 11 にかかるクロマトグラフィー試験片の製造方法は、請求項 8 ないし 10 のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片の製造方法において、上記界面活性剤が、コール酸系の界面活性剤を含むことを特徴とするものである。

【 0 0 2 4 】

また、請求項 12 にかかるクロマトグラフィー試験片の製造方法は、請求項 8 ないし 11 のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片の製造方法において、上記界面活性剤が、親水部に糖をもつ界面活性剤を含むことを特徴とするものである。

【 0 0 2 5 】

また、請求項 13 にかかるクロマトグラフィー試験片の製造方法は、請求項 8 ないし 12 のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片の製造方法において、上記反応層の乾燥が自然乾燥により行われることを特徴とするものである。

【 0 0 2 6 】

また、請求項 14 にかかるクロマトグラフィー試験片の製造方法は、請求項 8 ないし 12 のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片の製造方法において、上記反応層の乾燥が風乾により行われることを特徴とするものである。

【0027】

また、請求項15にかかるクロマトグラフィー試験片の製造方法は、請求項8ないし12のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片の製造方法において、上記反応層の乾燥が凍結乾燥により行われることを特徴とするものである。

【0028】

また、請求項16にかかるクロマトグラフィー試験片の製造方法は、請求項8ないし15のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片の製造方法において、上記界面活性剤溶解液が、上記反応層の全体に含浸、あるいはコーティングされたことを特徴とするものである。

【0029】

また、請求項17にかかるクロマトグラフィー試験片の製造方法は、請求項8ないし15のいずれか一つに記載のクロマトグラフィー試験片の製造方法において、上記界面活性剤溶解液が、上記反応層の一部に含浸、あるいはコーティングされたことを特徴とするものである。

【0030】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について、図面を参照しながら説明する。なお、ここで示す実施の形態はあくまでも一例であって、必ずしもこの実施の形態に限定されるものではない。

【0031】

(実施の形態1)

図1は、本発明の実施の形態1による単層の多孔質性材料よりなる横型クロマトグラフィー試験片を示す図である。

図1において、横型クロマトグラフィー試験片10は、反応層担体支持体1と、試料添加部2と、標識物保持部位3と、反応層4と、特異的タンパク固定化部5と、吸水部6とを備える。

【0032】

反応層担体支持体1は、液体不透過性のプラスチックなどからなり、クロマトグラフィー材料を支持する。試料添加部2は、吸収性の大きい不織布などからな

り、液体試料が添加あるいは塗布される。標識物保持部位 3 は、不織布などに溶解可能なように標識試薬を保持する。反応層 4 は、ニトロセルロースなどからなり、乾燥した際に固体となり得る性状の界面活性剤を溶解した界面活性剤溶解液が含浸処理され、その後、乾燥処理されている。ここで示す乾燥した際に固体となり得る性状の界面活性剤とは、高濃度状態の界面活性剤を真空あるいは凍結乾燥、または熱をかけての常圧下もしくは常温常圧下における乾燥作業を行った際に、塊化または顆粒、粉末といった固体の形状となり得るもののことを表す。なお、反応層 4 に対する含浸処理とは、反応層 4 を界面活性剤溶解液に浸漬する処理のことである。特異的タンパク固定化部 5 は、反応層 4 の領域上に、反応形式にあわせて、抗体あるいは抗原のような分析対象物に対して特異的に結合反応する特異的タンパク質を固定化する。吸水部 6 は、液体試料を最終的に吸収する。以上、試料添加部 2、標識物保持部位 3、反応層 4、特異的タンパク固定化部 5、及び吸水部 6 は、反応層担体支持体 1 の上部に形成されている。標識試薬、及び特異的タンパク質は、分析する試料、及び分析対象物に合わせて適切なものを選択する必要がある。

【 0 0 3 3 】

なお、界面活性剤溶解液に用いる界面活性剤としては、例えば、HLB 値が 20 以下の界面活性剤、非イオン性の界面活性剤、コール酸系の界面活性剤、あるいは親水部に糖を持つ界面活性剤等を含むものを使用する。

【 0 0 3 4 】

また、反応層 4 に含浸した界面活性剤溶解液の乾燥処理としては、例えば、常温常圧下に放置して乾燥する方法である自然乾燥、任意の温度下において一定の風力をかけることで乾燥する方法である風乾、あるいは凍結乾燥等がある。

【 0 0 3 5 】

また、横型クロマトグラフィー試験片 10 としては、ニトロセルロースやガラス繊維濾紙のような、任意の多孔質性担体で構成されたクロマトグラフィー材料からなる試験片が用いられる。

【 0 0 3 6 】

次に、本実施の形態 1 による横型クロマトグラフィー試験片 10 を用いたクロ

マトグラフ分析方法について説明する。

【 0 0 3 7 】

図 1 において、液体試料が試料添加部 2 に添加されると、試料添加部 2 に浸透し、標識物保持部位 3 に達する。次に、標識物保持部位 3 の領域に保持された標識試薬が、液体試料の浸透により溶解され、液体試料と共に反応層 4 に浸透する。そして、液体試料の浸透と共に反応層 4 に含まれた界面活性剤が溶解する。溶解した界面活性剤の作用により、反応層 4 の浸潤が速やかに行われ、液体試料の浸透は、浸透する液体の先端がそろった状態で、かつ滞ること無く進行する。反応層 4 の領域上には、特異的タンパク質が固定化された特異的タンパク固定化部 5 がある。液体試料が分析対象物を含む場合は、特異的タンパク質が分析対象物と標識試薬との複合体に対して抗原抗体反応を起こし、特異的タンパク固定化部 5 の領域に何らかの呈色反応が見られる。液体試料が分析対象物を含まない場合は、抗原抗体反応は起こらず、呈色反応も見られない。最終的に、液体試料は吸水部 6 に吸収され、反応は終了する。

【 0 0 3 8 】

以上のように、本実施の形態 1 による横型クロマトグラフィー試験片 1 0 によれば、クロマトグラフィー試験片 1 0 上の界面活性剤溶解液の含浸処理と乾燥処理により、反応層 4 の浸透性を向上させ、より均一な浸透が行われる。この浸透性の向上と、均一な浸透により、クロマトグラフィー試験片の反応性が向上し、より高感度で、より高性能なクロマトグラフィー測定を実現することのできる効果が得られる。また、界面活性剤として、乾燥した際に固体となり得る性状の界面活性剤を含んだものを用いることにより、液体試料が添加され反応層 4 に浸透するまで、反応層 4 は完全な乾燥状態にあるため、固定化された特異的タンパク質の失活を最低限に抑えることができ、クロマトグラフィー試験片の保存安定性の向上と、品質保持期間の長期化と、保管条件の緩和とを実現することができる。

----- 【 0 0 3 9 】 -----

また、界面活性剤として H L B 値が 2 0 以下の界面活性剤を含むものを用いることで、反応層 4 における液体試料の浸透速度が速すぎることにより反応が不十

分となることを回避することができる。さらに、HLB値を選択することにより適度な反応速度に調節することができ、より高感度かつ高性能なクロマトグラフィー測定を実現できる。

【0040】

また、界面活性剤として非イオン性の界面活性剤を含むものを用いることで、反応層4上への標識試薬の非特異吸着を回避でき、標識試薬が反応層4上にバックグラウンドとして残留することを防止できることにより、より高感度で、より高性能なクロマトグラフィー試験片による測定が可能となる。

【0041】

また、界面活性剤としてコール酸系の界面活性剤を含むものを用いることで、タンパク質に対しての影響を低減でき、固定化された特異的タンパク質の変性あるいは失活を最低限に抑えることが可能となり、反応層4の長期間の性能保持を実現できる。

【0042】

また、界面活性剤として親水部に糖を持つ界面活性剤を含むものを用いることで、糖の作用により溶解性が高く、浸透性が増す一方で、タンパク質に対しての影響が低いため、固定化された特異的タンパク質の変性あるいは失活を最低限に抑えることが可能となり、反応層4の長期間の性能保持を実現できる。

【0043】

また、反応層の乾燥を自然乾燥により行うことで、反応層に固定化された特異的タンパク質に対する負荷を低く抑えることが可能となり、試験片の長期間の性能保持を実現できる。

また、反応層の乾燥を風乾により行うことで、乾燥時間を短時間化することができ、乾燥中における特異的タンパク質の失活あるいは変性を最低限に抑えることが可能となり、試験片の長期間の性能保持を実現できる。

また、反応層の乾燥を凍結乾燥により行うことで、特異的タンパク質の性質をほぼ保持することが可能となり、試験片の長期間の性能保持を実現できる。

【0044】

(実施の形態2)

以下、本発明の実施の形態2による縦型クロマトグラフィー試験片について、図2、図3、及び図4を参照しながら説明する。

【0045】

図2は、本実施の形態2による複数の多孔質性材料を積層してなる縦型クロマトグラフィー試験片の構成を示す斜視図である。図3は、試料添加部側から見た縦型クロマトグラフィー試験片を示す斜視図である。図4は、最終的に試料を吸収する吸水部側から見た縦型クロマトグラフィー試験片を示す斜視図である。

【0046】

図2において、縦型クロマトグラフィー試験片20は、試料添加部11と、標識物保持部位12と、特異的タンパク固定化部13と、反応層14と、吸水部15とを備える。

試料添加部11は、吸収性の大きい不織布などからなり、液体試料が添加あるいは塗布される。標識物保持部位12は、不織布などに溶解可能なように標識試薬を保持する。特異的タンパク固定化部13は、反応層14の領域上に、反応形式にあわせて、抗体あるいは抗原のような分析対象物に対して特異的に結合反応する特異的タンパク質を固定化する。反応層14は、ニトロセルロースなどからなり、乾燥した際に固体となり得る性状の界面活性剤を溶解した界面活性剤溶解液が含浸処理され、その後、乾燥処理されている。なお、反応層14に対する含浸処理とは、反応層14を界面活性剤溶解液に浸漬する処理のことである。吸水部15は、反応層14上の反応結果を見るための結果確認窓16を有しており、液体試料を最終的に吸収する。以上、試料添加部11、標識物保持部位12、特異的タンパク固定化部13、反応層14、及び吸水部15は、積層されることにより、縦型クロマトグラフィー試験片20が形成される。標識試薬、及び特異的タンパク質は、分析する試料、及び分析対象物に合わせて適切なものを選択する必要がある。

【0047】

なお、界面活性剤溶解液に用いる界面活性剤としては、例えば、HLB値が20以下の界面活性剤、非イオン性の界面活性剤、コール酸系の界面活性剤、あるいは親水部に糖を持つ界面活性剤等を含むものを使用する。

また、反応層4に含浸した界面活性剤溶解液の乾燥処理としては、例えば、常温常圧下に放置して乾燥する方法である自然乾燥、任意の温度下において一定の風力をかけることで乾燥する方法である風乾、あるいは凍結乾燥等がある。

また、縦型クロマトグラフィー試験片20としては、ニトロセルロースやガラス繊維濾紙のような、任意の多孔質性担体で構成されたクロマトグラフィー材料からなる試験片が用いられる。

【0048】

次に、本実施の形態2による縦型クロマトグラフィー試験片20を用いたクロマトグラフ分析方法について説明する。

図2、図3、及び図4に示された縦型クロマトグラフィー試験片20上において、液体試料が試料添加部11に添加されると、試料添加部11に浸透し、標識物保持部位12に達する。次に、標識物保持部位12の領域に保持された標識試薬が、液体試料の浸透により溶解され、液体試料と共に反応層14に浸透する。そして、液体試料の浸透と共に反応層14に含まれた界面活性剤が溶解する。溶解した界面活性剤の作用により、反応層14の浸潤が速やかに行われ、液体試料の浸透は、浸透する液体の先端が比較的均一な状態で、かつ滞ること無く進行する。反応層14の領域上には、特異的タンパク質が固定化された特異的タンパク固定化部13がある。液体試料が分析対象物を含む場合は、特異的タンパク質が分析対象物と標識試薬との複合体に対して抗原抗体反応を起こし、特異的タンパク固定化部13の領域に何らかの呈色反応が見られる。この呈色反応は、吸水部15に設けられた結果確認窓16を通して見ることができる。液体試料が分析対象物を含まない場合は、抗原抗体反応は起こらず、呈色反応も見られない。最終的に、液体試料は吸水部15に吸収され、反応は終了する。

【0049】

以上のように、本実施の形態2による縦型クロマトグラフィー試験片20によれば、縦型クロマトグラフィー試験片20上の界面活性剤溶解液の含浸処理と乾燥処理により、反応層14の浸透性を向上させ、より均一な浸透が行われる。この浸透性の向上と、均一な浸透により、クロマトグラフィー試験片の反応性が向上し、より高感度で、より高性能なクロマトグラフィー測定を実現することので

きる効果が得られる。また、界面活性剤として、乾燥した際に固体となり得る性状の界面活性剤を含んだものを用いることにより、液体試料が添加され反応層 1 4 に浸透するまで、反応層 1 4 は完全な乾燥状態にあるため、固定化された特異的タンパク質の失活を最低限に抑えることができ、クロマトグラフィー試験片の保存安定性の向上と、品質保持期間の長期化と、保管条件の緩和とを実現することができる。

【 0 0 5 0 】

また、界面活性剤として H L B 値が 2 0 以下の界面活性剤を含むものを用いることで、反応層 1 4 における液体試料の浸透速度が速すぎるにより反応が不十分となることを回避することができる。さらに、H L B 値を選択することにより適度な反応速度に調節することができ、より高感度かつ高性能なクロマトグラフィー測定を実現できる。

【 0 0 5 1 】

また、界面活性剤として非イオン性の界面活性剤を含むものを用いることで、反応層 1 4 上への標識試薬の非特異吸着を回避でき、標識試薬が反応層 1 4 上にバックグラウンドとして残留することを防止することにより、より高感度で、より高性能なクロマトグラフィー試験片による測定が可能となる。

【 0 0 5 2 】

また、界面活性剤としてコール酸系の界面活性剤を含むものを用いることで、タンパク質に対しての影響を低減でき、固定化された特異的タンパク質の変性あるいは失活を最低限に抑えることが可能となり、反応層 1 4 の長期間の性能保持を実現できる。

【 0 0 5 3 】

また、界面活性剤として親水部に糖を持つ界面活性剤を含むものを用いることで、糖の作用により溶解性が高く、浸透性が増す一方で、タンパク質に対しての影響が低いため、固定化された特異的タンパク質の変性あるいは失活を最低限に抑えることが可能となり、反応層 1-4 の長期間の性能保持を実現できる。-----

【 0 0 5 4 】

また、反応層の乾燥を自然乾燥により行うことで、反応層に固定化された特異

的タンパク質に対する負荷を低く抑えることが可能となり、試験片の長期間の性能保持を実現できる。

また、反応層の乾燥を風乾により行うことで、乾燥時間を短時間化することができ、乾燥中における特異的タンパク質の失活あるいは変性を最低限に抑えることが可能となり、試験片の長期間の性能保持を実現できる。

また、反応層の乾燥を凍結乾燥により行うことで、特異的タンパク質の性質をほぼ保持することが可能となり、試験片の長期間の性能保持を実現できる。

【 0 0 5 5 】

なお、実施の形態 1 及び 2 における界面活性剤とは、分子内に水分子との親和性が強い親水性原子団と、水分子との親和性の弱い疎水性原子団を持つ界面、または表面の諸性質を変化させる性質を有する物質のことを総称している。

【 0 0 5 6 】

また、実施の形態 1 及び 2 では、クロマトグラフ分析で用いられる反応成分として、特異的タンパク質が反応層上に固定化された試験片について説明したが、これは一例であって、例えば、酵素のように反応の前後において何らかの変化を生じるものを、反応層に固定化された反応成分として用いてもよい。

【 0 0 5 7 】

図 5、及び図 6 は、酵素を用いたクロマトグラフィー試験片の構成を示す図である。

クロマトグラフィー試験片 3 0 は、試料添加部 1 1 と、反応試薬含浸部位 1 7 と、反応層 1 4 と、酵素固定化部 7 と、吸水部 1 5 とを備える。なお、反応層 1 4 の領域上に、酵素を固定化した酵素固定化部 7 以外の構成は、実施の形態 2 と同様であり、説明を省略する。

【 0 0 5 8 】

酵素を用いたクロマトグラフィー試験片 3 0 による測定において、液体試料が分析対象物を含む場合には、反応試薬含浸部位 1 7 に含浸された反応試薬と、酵素固定化部 7 に固定化された酵素の作用により、酵素固定化部 7 の領域に何らかの呈色が見られる。

【 0 0 5 9 】

このクロマトグラフィー試験片30においても、界面活性剤溶解液を、反応層14に含浸し、その後に乾燥させたことにより、実施の形態2と同様の効果を得ることができる。

【0060】

また、実施の形態1及び2では、界面活性剤として、HLB値が20以下の界面活性剤を含むものを用いるとしたが、好ましくは、HLB値が20に近い値であり、かつ、親水性原子団を多く持つ構造である界面活性剤を含むものを用いる。

【0061】

また、実施の形態1及び2では、界面活性剤として、コール酸系の界面活性剤を含むものを用いるとしたが、好ましくは、N, N-Bis(3-D-glucosamidopropyl)cholamideや、N, N-Bis(3-D-glucosamidopropyl)deoxycholamideなどのコール酸を母核とする界面活性剤を含むものを用いる。

【0062】

また、実施の形態1及び2では、親水部に糖を持つ界面活性剤を含むものを用いるとしたが、好ましくは、Sucrose Monolaurateや、n-Octyl- β -D-Thioglucosideなどの糖鎖を持つ構造を有した界面活性剤を含むものを用いる。

【0063】

また、実施の形態1及び2では、反応層4、14に対する界面活性剤処理は、反応層4、14の一部に対してなされても、全体に対してなされてもよい。

【0064】

また、実施の形態1及び2では、反応層4、14に対する界面活性剤処理は、反応層4、14に界面活性剤溶解液を含浸する含浸処理により行うとしたが、反応層4、14に界面活性剤溶解液をコーティングするコーティング処理により行ってもよい。

【0065】

また、実施の形態1及び2で示した界面活性剤の物質名は一部であり、上記以

外の界面活性剤を用いてもよい。

【0066】

【実施例】

以下の実施例により、本発明を実施する方法をさらに詳細に説明する。なお、本発明は、以下の実施例になんら制約されるものではない。

【0067】

(血漿中hCGの定量)

ニトロセルロース膜中に抗hCG- β 抗体固定化ライン、及び抗hCG- α 抗体と金コロイドとの複合体の広いバンドを含む免疫クロマトグラフィー試験片を製造した。この試験片を図1に示す。図中、試験片は、特異的タンパク固定化部5と、それよりも前にある抗hCG- α 抗体と金コロイドとの複合体が含有された領域である標識物保持部位3と、試料添加部2とを含む。これらの試験片は、次のようにして製造した。

【0068】

実施例1.

クロマトグラフィー試験片の調製

リン酸緩衝溶液にて希釈して濃度調整をした抗hCG- β 抗体溶液を準備した。この抗体溶液を溶液吐出装置を用いて、ニトロセルロース膜上に塗布した。これにより、ニトロセルロース膜上に検出用の抗体固定化ラインが得られた。このニトロセルロース膜を乾燥後、1%スキムミルクを含有するTris-HCl緩衝溶液中に浸漬して30分間緩やかに振った。30分後、Tris-HCl緩衝溶液槽に膜を移動し、10分間緩やかに振った後に、別のTris-HCl緩衝溶液槽にて更に10分間緩やかに振り、膜の洗浄を行なった。2度洗浄を行った後に、0.05% Sucrose Monolaurate (同仁化学製) を含有するTris-HCl緩衝溶液中に浸漬して10分間緩やかに振った膜を液槽から取り出して、室温で乾燥させた。

【0069】

金コロイドは、0.01%塩化金酸の還流中の100℃溶液に1%クエン酸溶液を加えることによって調製した。還流を30分間続けた後に、冷却した。0.

2Mの炭酸カリウム溶液によって、pH9に調製した前記金コロイド溶液に、抗hCG- α 抗体を加えて数分間攪拌した後に、10%BSA（牛血清アルブミン）溶液pH9を最終1%になる量だけ加えて攪拌することで、抗体金コロイド複合体（標識抗体）を調製した。前記標識抗体溶液を4℃、20000Gで50分間遠心分離することによって、標識抗体を単離して、それを洗浄緩衝液（1%BSA・リン酸緩衝液）中に懸濁した後に、前記遠心分離を行って、標識抗体を洗浄単離した。この標識抗体を洗浄緩衝液で懸濁して、0.8 μ mのフィルタにて濾過した後に、当初の金コロイド溶液量の10分の1に調製して、4℃で貯蔵した。

【0070】

前記標識抗体溶液を溶液吐出装置にセットして、抗hCG- β 抗体固定化乾燥膜上の抗体固定化位置から離れた位置に塗布した後に、膜を乾燥させた。これによって、固定化膜上に標識抗体保持部位が得られた。

【0071】

こうして調製された標識抗体保持部位を含む抗体固定化膜を、反応層担体支持体上に貼付け、不織布を試料添加部として、ガラス繊維ろ紙を吸水部として、付け加えてから0.5cm幅の細片に切断して、試験片を作製した。

【0072】

実施例2.

試料の調製

抗凝固剤としてヘパリンを加えた人の血液を4000rpmにて、5分間遠心分離を行って血球を分離した血漿を調製した。この血漿に既知濃度のhCG溶液を加えることにより、さまざまな既知濃度のhCG溶液を調製した。

【0073】

実施例3.

試験片上の呈色度合の測定

試験片上の試料添加部にhCGを含む血漿を200 μ l以上添加して、吸水部方向へと展開処理して、抗原抗体反応をさせて抗体固定化部における呈色反応を行った。この試験片への試料添加から5分後の呈色状況を反射型分光光度計（C

S9300；島津製作所製）を用いて計測して、呈色度を演算処理した。

【0074】

0、100、1000、10000 U/l の hCG を含有する血漿を試験片に添加して展開処理した。各 hCG 濃度の血漿に対する試験片上の抗体固定化部の呈色状況を反射型分光光度計で測定した。520 nm の波長における吸光度を計測して、予め作成しておいた hCG 濃度と吸光度との関係を示す検量線に代入した。その結果を図7に示す。本来、例えば1000 U/l の hCG を含有する血液の吸光度を計測し、その吸光度を検量線に代入すると、hCG 濃度は1000 U/l となるはずであるが、実際には、少しずれる。そのずれの大きさにより、その測定の正確さを知ることができる。

【0075】

図7は、クロマトグラフィー試験片において、反応層を界面活性剤で処理していない場合（a）と、界面活性剤で処理した場合（b）との定量性能を示す図である。横軸は、試験片に添加した試料の hCG 濃度を表す。縦軸は、試験片上の呈色領域における標識物からの信号を検量線に代入して求めた抗原濃度の換算値を表す。

【0076】

以下、クロマトグラフィー試験片において、反応層を界面活性剤で処理していない場合と、界面活性剤で処理した場合について、その効果を説明する。

図7において、クロマトグラフィー試験片に液体試料を添加し、5分後の呈色度合の測定値をもとに、分析対象物の濃度を換算した結果を表している。この際に使用した標識試薬は、（a）、（b）共に同じ抗体-金コロイド複合体を使用している。まず、界面活性剤で反応層を処理した場合（図7（b））は、CV値（変動係数）が0～7%であるのに対して、界面活性剤で処理していない場合（図7（a））は、CV値が15～35%と、大きなばらつきを示し、定量性能が悪いことがわかる。以上の結果から、クロマトグラフィー試験片において、界面活性剤を含浸処理した反応層を用いることは、定量性能の向上に大きく関与していることが理解できる。今回は定量性能について比較説明を行ったが、定性試験においても界面活性剤を含浸処理した反応層を有したクロマトグラフィー試験片

を用いた方が、より正確な測定結果が得られている。

【0077】

なお、本実施例においては、金コロイドを標識物として用いているため、520 nmの波長における呈色度合を測定したが、標識物が持つ吸収波長であれば、どの波長における吸光度を測定しても良い。

【0078】

【発明の効果】

請求項1、請求項6、及び請求項7のクロマトグラフィー試験片によれば、複数の多孔質性材料を積層してなる、あるいは単層の多孔質性材料よりなるクロマトグラフィー試験片において、クロマトグラフ分析で用いられる反応成分の少なくとも一つが固定化された反応層が、乾燥した際に固体となり得る性状の界面活性剤を含むものとしたことで、反応層の浸透性の向上と、均一な試料の浸透によりクロマトグラフィー試験片の反応性を向上させることができ、より高感度で、高性能なクロマトグラフィー測定を実現することのできる効果が得られる。また、界面活性剤として、乾燥した際に固体となり得る性状の界面活性剤を用いることにより、反応層に固定化された反応成分の失活を最低限に抑えることができ、クロマトグラフィー試験片の保存安定性の向上と、品質保持期限の長期化と、保管条件の緩和とを実現することができる。

【0079】

請求項2のクロマトグラフィー試験片によれば、界面活性剤としてHLB値が20以下の界面活性剤を含むものを用いることで、請求項1の効果に加え、反応層における液体試料の浸透速度が速すぎることにより反応が不十分となることを回避することができ、さらに、HLB値を選択することにより適度な反応速度に調節することができ、より高感度かつ高性能なクロマトグラフィー測定を実現できる効果も得られる。

【0080】

請求項3のクロマトグラフィー試験片によれば、界面活性剤として非イオン性の界面活性剤を含むものを用いることで、請求項1の効果に加え、反応層上への標識試薬の非特異吸着を回避でき、標識試薬が反応層上にバックグラウンドとし

て残留することを防止できることにより、より高感度で、より高性能なクロマトグラフィー試験片による測定が可能となる効果も得られる。

【 0 0 8 1 】

請求項 4 のクロマトグラフィー試験片によれば、界面活性剤としてコール酸系の界面活性剤を含むものを用いることで、請求項 1 の効果に加え、タンパク質に対しての影響を低減でき、固定化された特異的タンパク質の変性あるいは失活を最低限に抑えることが可能となり、反応層の長期間の性能保持を実現できる効果も得られる。

【 0 0 8 2 】

請求項 5 のクロマトグラフィー試験片によれば、界面活性剤として親水部に糖を持つ界面活性剤を含むものを用いることで、請求項 1 の効果に加え、糖の作用により溶解性が高く、浸透性が増す一方で、タンパク質に対しての影響が低いいため固定化された特異的タンパク質の変性あるいは失活を最低限に抑えることが可能となり、反応層の長期間の性能保持を実現できる効果も得られる。

【 0 0 8 3 】

請求項 8、請求項 1 6、及び請求項 1 7 のクロマトグラフィー試験片の製造方法によれば、クロマトグラフ分析で用いられる反応成分の少なくとも一つが固定化された反応層を有するクロマトグラフィー試験片の製造方法において、乾燥した際に固体となり得る性状の界面活性剤を溶解した界面活性剤溶解液を、上記クロマトグラフィー試験片の反応層に含浸、あるいはコーティングするステップと、上記反応層に、含浸、あるいはコーティングした界面活性剤溶解液を乾燥させるステップとを備えたことで、反応層の浸透性の向上と、均一な試料の浸透によりクロマトグラフィー試験片の反応性を向上させることができ、より高感度で、高性能なクロマトグラフィー試験片を製造できる効果が得られる。また、界面活性剤として、乾燥した際に固体となり得る性状の界面活性剤を用いることにより、反応層に固定化された反応成分の失活を最低限に抑えることができ、保存安定性の向上と、品質保持期限の長期化と、保管条件の緩和とを実現したクロマトグラフィー試験片を製造することができる。

【 0 0 8 4 】

請求項 9 のクロマトグラフィー試験片の製造方法によれば、界面活性剤として HLB 値が 20 以下の界面活性剤を含むものを用いることで、請求項 8 の効果に加え、反応層における液体試料の浸透速度が速すぎることにより反応が不十分となることを回避することができ、さらに、HLB 値を選択することにより適度な反応速度に調節することができ、より高感度かつ高性能なクロマトグラフィー試験片を製造できる効果も得られる。

【0085】

請求項 10 のクロマトグラフィー試験片の製造方法によれば、界面活性剤として非イオン性の界面活性剤を含むものを用いることで、請求項 8 の効果に加え、反応層上への標識試薬の非特異吸着を回避でき、標識試薬が反応層上にバックグラウンドとして残留することを防止できることにより、より高感度で、より高性能なクロマトグラフィー試験片の製造が可能となる効果も得られる。

【0086】

請求項 11 のクロマトグラフィー試験片の製造方法によれば、界面活性剤としてコール酸系の界面活性剤を含むものを用いることで、請求項 8 の効果に加え、タンパク質に対しての影響を低減でき、固定化された特異的タンパク質の変性あるいは失活を最低限に抑えることが可能となり、長期間の性能保持が可能なクロマトグラフィー試験片を製造できる効果も得られる。

【0087】

請求項 12 のクロマトグラフィー試験片の製造方法によれば、界面活性剤として親水部に糖を持つ界面活性剤を含むものを用いることで、請求項 8 の効果に加え、糖の作用により溶解性が高く、浸透性が増す一方で、タンパク質に対しての影響が低いため固定化された特異的タンパク質の変性あるいは失活を最低限に抑えることが可能となり、長期間の性能保持が可能なクロマトグラフィー試験片を製造できる効果も得られる。

【0088】

請求項 13 のクロマトグラフィー試験片の製造方法によれば、反応層の乾燥を自然乾燥により行うことで、請求項 8 の効果に加え、反応層上に固定化された反応成分に対する負荷を低く抑えることが可能となるため、処理された反応層の性

能を長期間保持することのできるクロマトグラフィー試験片を製造できる効果も得られる。

【 0 0 8 9 】

請求項 1 4 のクロマトグラフィー試験片の製造方法によれば、反応層の乾燥を風乾により行うことで、請求項 8 の効果に加え、乾燥時間を短時間化することができ、乾燥中における固定化反応成分の失活あるいは変性を最低限にすることが可能となり、処理された反応層の性能を長期間保持することのできるクロマトグラフィー試験片を製造できる効果も得られる。

【 0 0 9 0 】

請求項 1 5 のクロマトグラフィー試験片の製造方法によれば、反応層の乾燥を凍結乾燥により行うことで、請求項 8 の効果に加え、固定化反応成分の性質をほぼ保持することが可能となり、処理された反応層の性能を長期間保持することのできるクロマトグラフィー試験片を製造できる効果も得られる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の実施の形態 1 による横型クロマトグラフィー試験片の構成を示す図である。

【図 2】

本発明の実施の形態 2 による縦型クロマトグラフィー試験片の構成を示す斜視図である。

【図 3】

本発明の実施の形態 2 による縦型クロマトグラフィー試験片を示す斜視図である。

【図 4】

本発明の実施の形態 2 による縦型クロマトグラフィー試験片を示す斜視図である。

【図 5】

酵素を用いたクロマトグラフィー試験片の構成を示す図である。

【図 6】

酵素を用いたクロマトグラフィー試験片の構成を示す図である。

【図 7】

本発明の実施例による反応層の処理として界面活性剤を用いない場合（a）と、界面活性剤を用いた場合（b）との定量性能を示す図である。

【図 8】

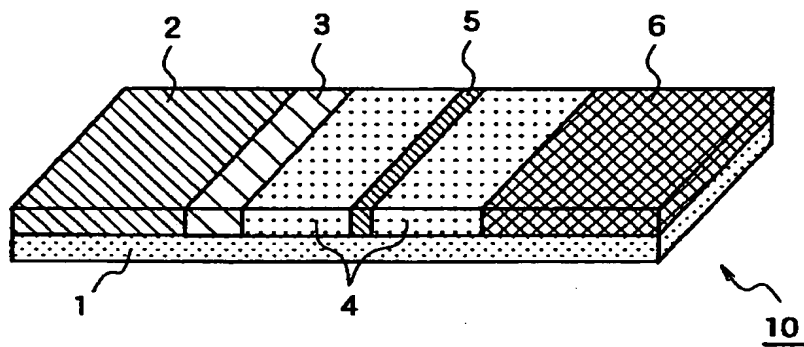
従来のクロマトグラフィー試験片を示す図である。

【符号の説明】

- 1 反応層担体支持体
- 2、1 1 試料添加部
- 3、1 2 標識物保持部位
- 4、1 4 反応層
- 5、1 3 特異的タンパク固定化部
- 6、1 5 吸水部
- 7 酵素固定化部
- 1 6 結果確認窓
- 1 7 反応試薬含浸部位
- 1 0 横型クロマトグラフィー試験片
- 2 0 縦型クロマトグラフィー試験片
- 3 0 クロマトグラフィー試験片

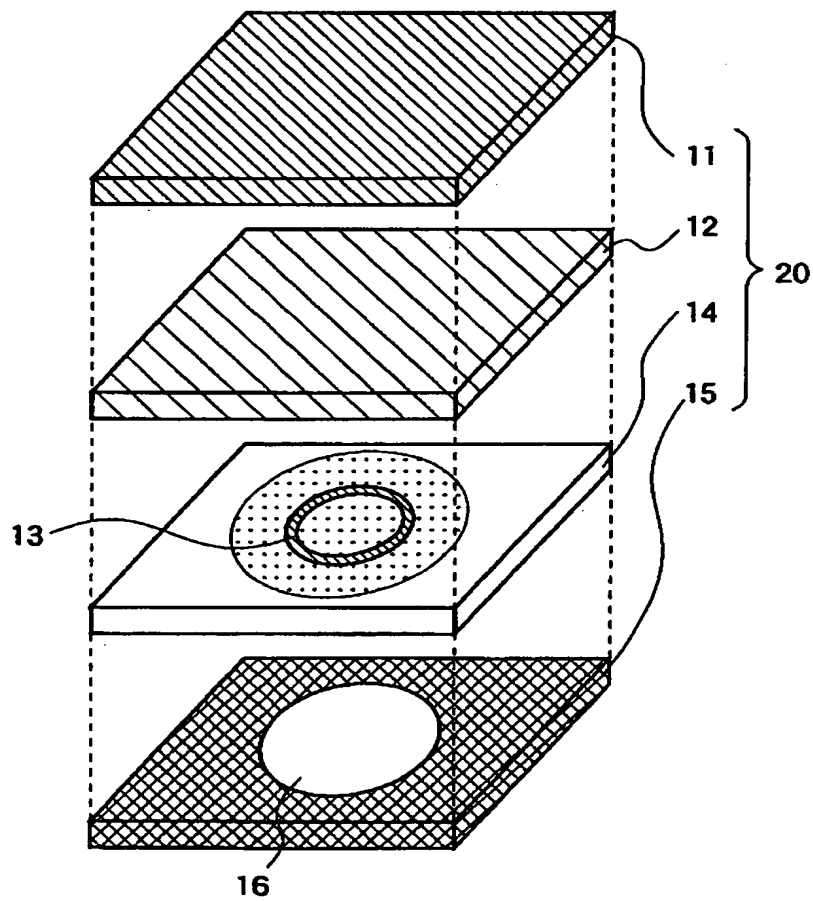
【書類名】 図面

【図 1】

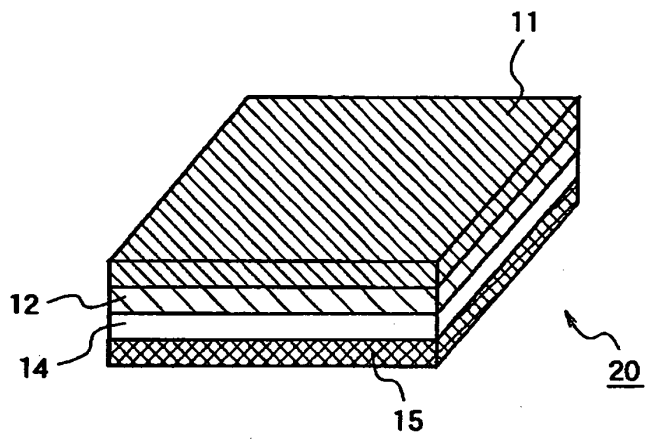


4: 反応層
5: 特異的タンパク固定化部
10: 模型クロマトグラフィー試験片

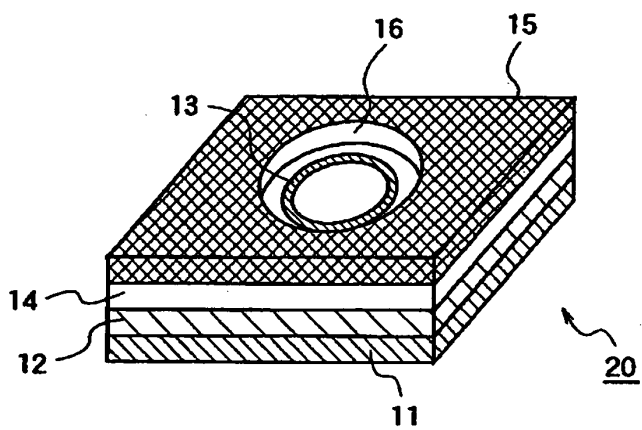
【図 2】



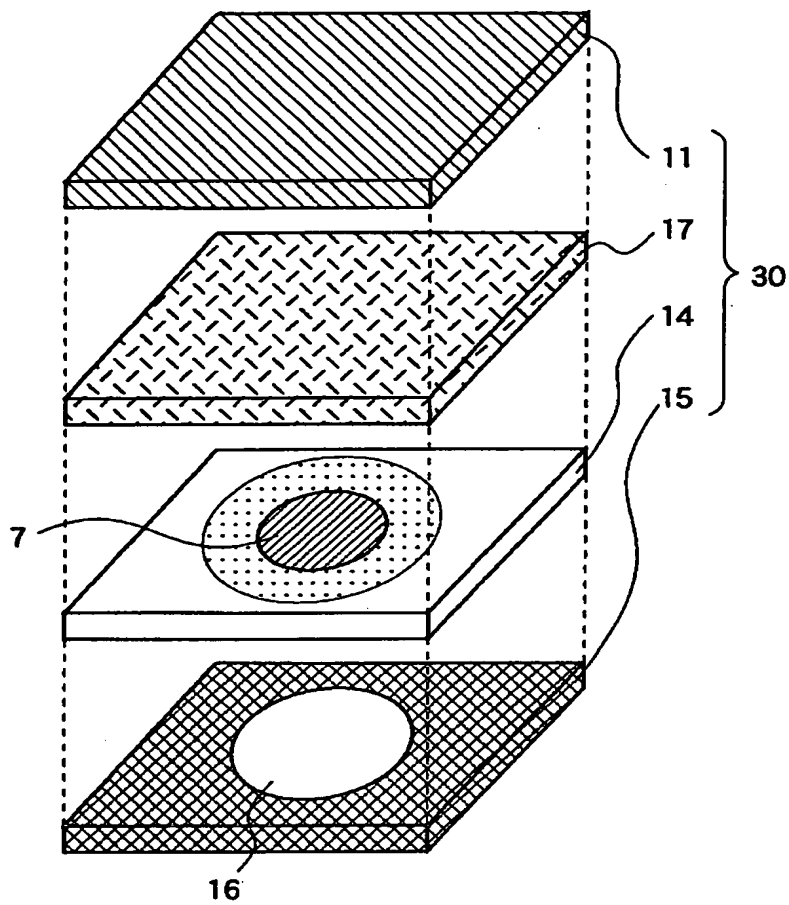
【図 3】



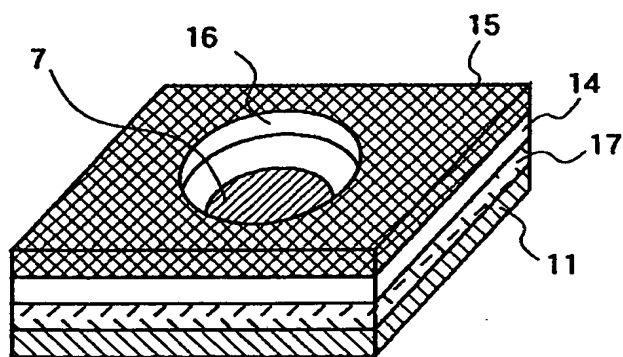
【図 4】



【図 5】

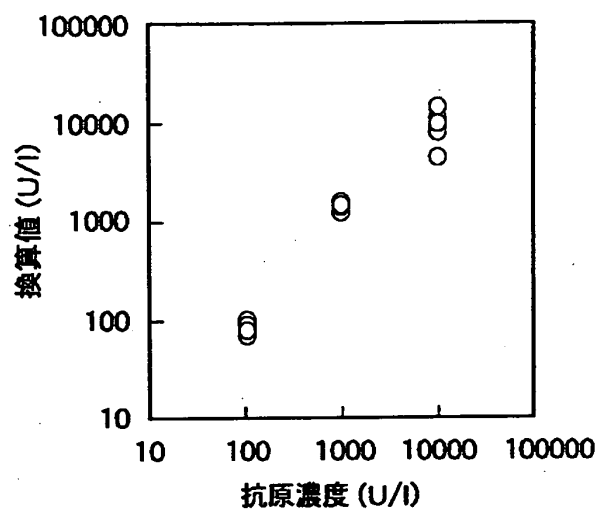


【図 6】

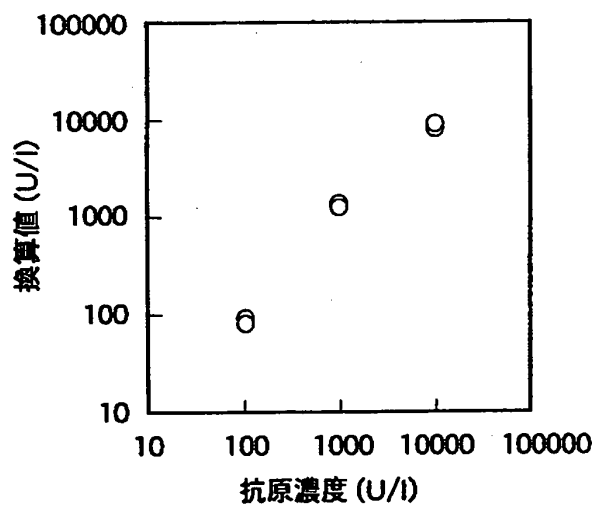


【図 7】

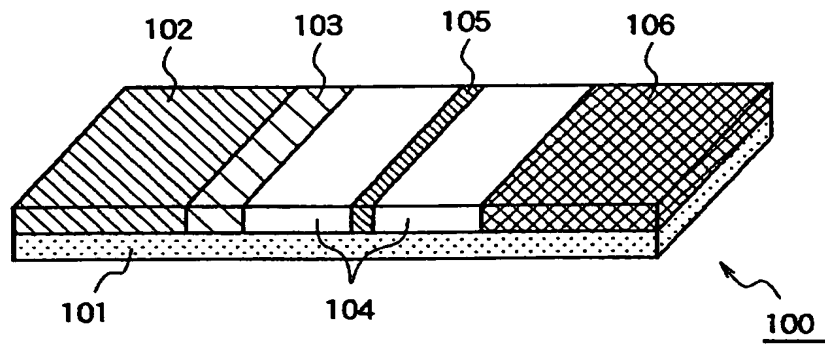
(a) 界面活性剤なし



(b) 界面活性剤あり



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 クロマトグラフィー試験片の反応層における浸透速度と浸透性の向上、浸透の均一化、及び測定性能の向上を実現可能なクロマトグラフィー試験片、及びその製造方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 クロマトグラフィー試験片 1 0 を、液体試料が添加される試料添加部 2 と、標識試薬を保持する標識物保持部位 3 と、標識試薬と分析対象物との結合反応が行われる反応層 4 と、反応層 4 の領域中に特異的タンパク質を保持する特異的タンパク固定化部 5 と、試料を吸収する吸水部 6 とを有する構成とし、反応層 4 に、乾燥した際に固体となり得る性状の界面活性剤溶解液を含浸した後に、反応層 4 の乾燥処理を行う。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005821]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府門真市大字門真1006番地
氏 名	松下電器産業株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)